

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390344

研究課題名（和文）CD47-SIRP シグナル制御による移植抗原反応性 T 細胞・B 細胞性
免疫応答の抑制研究課題名（英文）Inhibition of xeno-antigen reactive T cells and B cells
by regulation of CD47-SIRP signaling

研究代表者

大段 秀樹 (OH DAN HIDEKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10363061

研究成果の概要（和文）：

我々は CD47-SIRP シグナル誘導により異種反応性マクロファージ応答が抑制されることを *in vitro* で解明してきた。本研究では、CD47-SIRP シグナル誘導により異種反応性 CD4⁺T 細胞応答は間接認識経路を介した応答は抑制されるが、直接認識経路を介した応答には影響を及ぼさないことを *in vitro* で解明した。また CD47-SIRP シグナル伝達誘導により、マクロファージ性異種細胞拒絶反応が抑制できることを *in vivo* モデルにおいて証明した。

研究成果の概要（英文）：

We have previously proven that the interspecies incompatibility of CD47 results in phagocytosis of xenogeneic cells by macrophages *in vitro*. In this study, we demonstrated that interspecies incompatibility of CD47 contributed to the *in vitro* responses of xenoreactive CD4⁺ T cell through the indirect pathway, but not the direct pathway. We also demonstrated that genetic induction of recipient species CD47 on xenograft cells could prevent macrophage-mediated rejection using an *in vivo* model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：移植外科学 移植免疫学 CD47

1. 研究開始当初の背景

臓器移植ドナー不足の解決策として、生理学的・解剖学的類似性からブタを用いた異種移植に期待がかかる。しかしブターヒト間異種移植では激しい液性および細胞性拒絶反応が障壁となる。我々はブタ移植片に対するヒトマクロファージ性拒絶反応を回避するには、ヒト CD47 遺伝子導入ブタの作製が必要であるとの報告し、世界的に同意が得られた。

ヒト CD47 トランスジェニック (Tg) ブタからの組織・臓器移植を想定する場合、異種間 CD47-SIRP システムの修飾が拒絶機構における免疫担当細胞間ネットワークにおよぼす影響を解明する必要がある。特に、獲得免疫機構においては、ブタ抗原提示細胞へのヒト CD47 分子遺伝子導入によって、宿主 T 細胞への SIRP を介した抑制シグナルが誘導される可能性が期待される。

2. 研究の目的

本研究は、異種移植の際に自然免疫応答に引き続き起こる獲得免疫応答のうち、抗原提示細胞と T 細胞、B 細胞と NKT 細胞の細胞間コミュニケーションにおける CD47-SIRP 抑制シグナルの機能解析と、CD47 遺伝子の修飾による異種間過剰免疫応答の制御の可能性を *in vitro* で証明する。さらに、レシピエント種 CD47 遺伝子のドナー細胞への移入による獲得免疫応答の制御を *in vivo* で解析し得る小動物モデルを開発し、疾患モデルによる移植片生着効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 異種性 T 細胞応答における CD47-SIRP シグナル伝達の *in vitro* 解析

ヒト T 細胞上には、マクロファージや樹状細胞に存在する SIRP α は発現せず、CD47 と相互作用して抗原特異的 T 細胞増殖に関わる SIRP γ を発現している。ブタ-ヒト間 CD47 相同性の相違が CD47-SIRP α および CD47-SIRP γ シグナル伝達を介した異種性ヒト T 細胞応答に対してどのように影響しているのかリンパ球混合試験 (MLR) で解析した。

(2) レシピエント種 CD47 遺伝子のドナー細胞への移入による免疫応答の制御を *in vivo* で解析し得る小動物モデルを開発

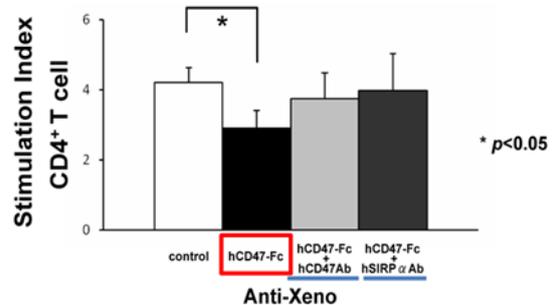
① NOD/SCID マウスの SIRP α はヒト CD47 と交差反応性があるため、NOD/SCID マウスの腎被膜下にヒト CD47 発現ブタリンパ芽球様細胞を移植し、生着効果を観察した。
② ラット-マウス間モデルでマクロファージ性拒絶機構が回避できるか否か解析を行った。ストレプトゾトシンで糖尿病化した RAG2/ γ c ダブルノックアウトマウス (T, B, NK 細胞が存在せず、マクロファージ機能は正常) にマウス CD47 を発現したラットインスリノーマもしくはコントロールベクターを遺伝子導入したインスリノーマを腹腔内投与し血糖値の推移を観察した。

4. 研究成果

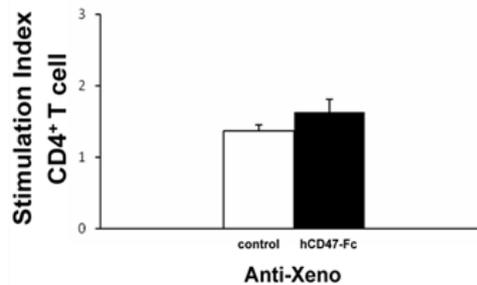
(1) 反応系に可溶性ヒト CD47-Fc 融合蛋白を添加すると異種反応性ヒト CD4 陽性 T 細胞の Stimulation Index (SI) は有意に低値となり、CD47 ないし SIRP α ブロッキング抗体をさらに添加するとその差は認めなくなった。また、異種間 CD47-SIRP γ の相互作用を解析するため、responder から抗原提示細胞を除去し T 細胞のみとした条件下で CD47-Fc 添加 MLR を行った。CD47-Fc を添加しても非添加群と SI 値に有意差を認めなかった。

以上より、CD47-Fc 添加によるヒト異種性 T 細胞応答は、間接認識経路を介した反応は抑

制されるが直接認識経路を介した反応には影響を及ぼさないことを解明した。つまりブタ-ヒト間 CD47 相同性の相違により間接認識経路を介した CD47-SIRP α 抑制性シグナルが伝達されず強力な異種性 CD4+T 細胞応答を引き起こしている可能性が示唆された。



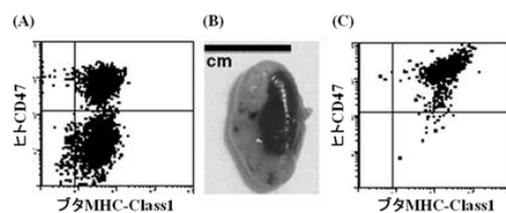
Unfractionated Responders
ブタ-ヒト間リンパ球混合試験系に可溶性ヒトCD47Fc 蛋白を添加すると、ブタ細胞に対するヒトT細胞応答が減弱する。またCD47-SIRP α シグナル伝達阻害を行うとヒトCD47Fc添加によるヒトT細胞応答の減弱は認められない。



APC-depleted Responders
ブタ-ヒト間リンパ球混合試験系においてブタ抗原提示細胞を除去後にCD47Fc蛋白を添加しても、ヒトT細胞応答に変化を認めない。

(2)

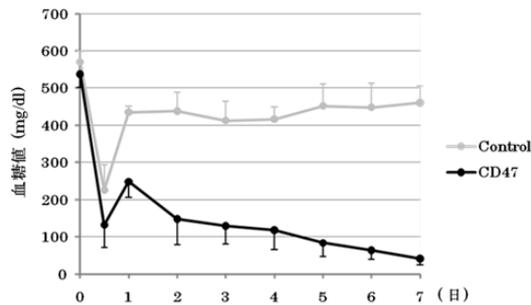
① ヒト CD47 を高発現したブタリンパ芽球様細胞と無処置のブタリンパ芽球様細胞を 1:1 に混合し、NOD/SCID マウスの腎被膜下に移植、2 週間後に腎臓を摘出しフローサイトメトリーで腫瘍細胞を確認したところ、ヒト CD47 を高発現した細胞集団のみを確認した。



ヒトCD47を高発現したブタリンパ芽球様細胞と無処置のブタリンパ芽球様細胞を1:1に混合し(A)、NOD/SCIDマウスの腎被膜下に移植。2週間後、腎臓を摘出し被膜下に腫瘍を確認(B)。フローサイトメトリーで腫瘍細胞を確認したところ、ヒトCD47を高発現した細胞集団のみを確認した(C)。

② ストレプトゾトシンで糖尿病化した RAG2/ γ c ダブルノックアウトマウスにマウス CD47 を発現したラットインスリノーマもし

くはコントロールベクターを遺伝子導入したところ、インスリノーマを腹腔内投与しマウス CD47 発現ラットインスリノーマではコントロールと比べ有意に血糖降下を認めた。



マウスCD47を高発現したラットインスリノーマ細胞INS-1Eを糖尿病化したRAG2^{yc}DKOマウスへ腹腔内投与を行ったところ、コントロールベクターを遺伝子導入したラットインスリノーマ投与に比べ有意に血糖降下を認めた。

以上より *in vivo* 疾患モデルにおけるレシピエント種 CD47 遺伝子導入による自然免疫応答の抑制を証明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Wang C, Wang H, Ide K, Wang Y, Van Rooijen N, Ohdan H, Yang YG. Human CD47 expression permits survival of porcine cells in immunodeficient mice that express SIRP α capable of binding to human CD47. Cell Transplant. 2011. In press. (査読有)

2. Basnet NB, Ide K, Tahara H, Tanaka Y, Ohdan H. Deficiency of N-glycolylneuraminic acid and Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc epitopes in xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies. Xenotransplantation. 2010; 17(6):440-448. (査読有)

3. Tahara H, Ide K, Basnet N, Tanaka Y, Ohdan H. Determination of the precursor frequency and the reaction intensity of xenoreactive human T lymphocytes. Xenotransplantation. 2010; 17(3):188-196. (査読有)

4. Tahara H, Ide K, Basnet NB, Tanaka Y, Matsuda H, Takematsu H, Kozutsumi Y, Ohdan H. Immunological property of antibodies against N-glycolylneuraminic acid epitopes in cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase-deficient mice. J Immunol. 2010; 184(6):3269-3275. (査読有)

5. Igarashi Y, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. Xenotransplantation. 2008; 15(4):235-45. (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. Hiroyuki Tahara, Role of CD47-SIRP Signaling in the Responses of Human T Cells with Direct and indirect Xenospecificity. American Transplant Congress 2010 2010年5月2日 アメリカ サンディエゴ

2. 田原裕之, 異種移植における異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid (NeuGc) の抗原性 第 37 回 舘・舘島移植研究会 2010年3月12日 宇都宮

3. 田原裕之, ブタ-ヒト異種間 T 細胞応答における CD47-SIRP シグナルの役割 第 13 回 日本異種移植研究会 2010年3月14日 東京

4. Nabin Basnet, 健康人における α -Gal および N-glycolylneuraminic acid (NeuGc) に対する自然抗体価と細胞傷害性の比較 第 13 回 日本異種移植研究会 2010年3月14日 東京

5. Nabin Basnet, N-glycolylneuraminic acid is recognized by naturally occurring cytotoxic human xenoantibodies 第 45 回 日本移植学会総会 2009年9月17日 東京

6. 田原裕之, 異種移植における異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid (NeuGc) の役割 第 45 回 日本移植学会総会 2009年9月17日 東京

7. Hiroyuki Tahara, Evidence of cytotoxicity of non-Gal antibodies against N-glycolylneuraminic acid determinants in xenotransplantation by using CMAH^{-/-} mice. American Transplantation Congress 2009 2009年6月3日 アメリカ ボストン

8. Nabin Basnet, Deficiency of N-glycolylneuraminic acid besides Gal α 1,3Gal on xenogeneic cells attenuates cytotoxicity of human natural antibodies American Transplantation Congress 2009

2009年5月30日 アメリカ ポストン

9. Hiroyuki Tahara, N-glycolylneuraminic acid— A novel target for rejection in islet xenotransplantation — Joint Conference of CTS&JSOPMB 2009年4月21日 岡山

10. 田原裕之, 異種抗原 N-Glycolylneuraminic acid (NeuGc) は異種臓器移植における拒絶の標的となる 第12回日本異種移植研究会 2009年3月7日 鹿児島

11. Nabin Basnet, 健常人における α -Gal および N-Glycolylneuraminic acid (NeuGc) に対する自然抗体価と細胞障害性の比較 第12回日本異種移植研究会 2009年3月7日 鹿児島

12. 田原裕之, CD47-SIRP システムを介した異種 T 細胞性拒絶反応制御の可能性 第44回日本移植学会総会 2008年9月21日 大阪

13. Nabin Basnet, Comparative detection of cytotoxic natural antibody against α -Gal and NeuGc epitope in healthy human sera 第44回日本移植学会総会 2008年9月21日 大阪

14. Kentaro Ide, Human CD47 on porcine antigen presenting cells have possibility of preventing T cell-mediated xenograft rejection through inhibitory signaling to SIRP α . XXII International Congress of The Transplantation Society 2008年8月13日 オーストラリア シドニー

15. Hiroyuki Tahara, Role for CD47-SIRP α signaling in human T cell proliferation in response to stimulation with porcine antigen presenting cells. American Transplantation Congress 2008 2008年6月1日 カナダ トロント

16. Hiroyuki Tahara, In vitro and in vivo evidence of cytotoxicity of antibodies against N-Glycolylneuraminic Acid in xenotransplantation. American Transplantation Congress 2008 2008年6月1日 カナダ トロント

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大段 秀樹 (OHDAN HIDEKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教

授

研究者番号：10363061

(2) 研究分担者

井手 健太郎 (KENTARO IDE)

広島大学・病院・助教

研究者番号：50511565

田中 友加 (TANAKA YUKA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90432666

(3) 連携研究者

()

研究者番号：